

Fermentation of indigestible carbohydrates by the gut microbiota

Citation for published version (APA):

Aguirre Morales, M. (2016). *Fermentation of indigestible carbohydrates by the gut microbiota: one small step for a microbe, a giant leap for mankind ?* [Doctoral Thesis, Maastricht University].
<https://doi.org/10.26481/dis.20160704ma>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20160704ma](https://doi.org/10.26481/dis.20160704ma)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

There is an elevated incidence of cases of obesity worldwide. The World Health Organization estimated that by 2014 over 600 million of adults were obese. Furthermore, this health problem also extends to children: 42 million children under the age of 5 were overweight or obese in 2013. For the first time in human history there are more obese people in the world than underweight people. Obese subjects are not only more prone to disease but also suffer from a lower quality of life and they lead to more cost to the health care system. Therefore, the development of strategies to tackle this condition is of vital importance. The potential role of gut microbiota in obesity has recently emerged as a promising therapeutic tool. Therefore, this work aimed to: i) contribute to know what the impact of the gut microbiota is on obesity when fermenting indigestible dietary compounds, and ii) elucidate the plasticity of the microbiota to manipulation and the potential to modify an obese gut phenotype. The literature evidence on the role of the microbiota in obesity is reviewed in **Chapter 1**.

Chapter 2 focuses on the differences related to the composition and activity of an individual or a pooled preparation of human fecal inoculum during a standard fermentation process. Many *in vitro* studies generally use a standardized inoculum which is derived from a pool of subjects of interest and is stored frozen. However, the use of an inoculum prepared from either a single donor or a pool of donors remains debatable among experts. The main argument lies in the concern about how representative such inoculum is in regard to the colonic ecosystem taking into account the abundance and the variety of bacterial species. Consequently, the use of an individual or a mixed inoculum is believed to lead to a degree of variation among experiments, even when the single inoculum is repeatedly taken from the same individual over time. With respect to the TIM-2 system, no studies were performed before in order to characterize such possible variations. Therefore, the purpose of this study was to compare both ways of preparing a fecal inoculum to be used *in vitro*. The results obtained after assessing the suitability of using the two types of inocula showed that the microbiota prepared from a pool of volunteers does not result in an aberrant composition or functional performance. These findings are a keystone for performing an evaluation and improvement of the standardized methods for preparing the inoculum itself.

Chapter 3 investigated an optimal preservation approach to prepare human feces as inoculum for *in vitro* fermentations as an alternative to the use of fresh feces. Freshly collected fecal samples may not always be available. In some circumstances, the use of fresh human microbiota is not possible because donors live far away from the laboratory or because they are not continuously available to repeatedly participate at various times during the study. To guarantee a constant inoculum over time for different studies, most studies use prepared and stored

inocula. In these cases, the use of frozen feces provides more flexibility for this type of experiments. However, preparation and storage of fecal samples have been shown to impact microbial composition, viability and activity. It is unknown to what extent various preparation and storage methods impact the microbiota and what preservation method is best. Hence, the effects of different treatments used to prepare human feces as inocula for *in vitro* fermentation experiments were studied. This study allowed us to propose an easy and optimal preparation for the conservation of feces for *in vitro* fermentation studies which compositionally and functionally resembled quite closely the golden standard or reference (fresh feces). These findings contribute to increase the reproducibility of the *in vitro* assays that can be performed over a long period of time with the same microbiota batch, which is impossible with a single fresh fecal sample.

Chapter 2 and **3** are chapters in this thesis which partially covered the study of different criteria needed to be fulfilled by *in vitro* gut models before they are considered valid for monitoring the effects of specific interventions/treatments on the microbiota. However, it is equally important to ensure the repeatability, robustness and reproducibility of the model itself. **Chapter 4** investigated compositionally and functionally the microbial community developed in TIM-2 in a 72 h fermentation on a diet high in carbohydrate or high in protein using powerful molecular techniques. This study was performed in order to test if the network connecting diet, microbiota and metabolites production was reproduced in different replicate experiments using the TIM-2 system under the same experimental conditions. Our results indicate the strong reproducibility of the communities developing in TIM-2 at both the level of composition and functionality.

After evaluating the methodological considerations and challenges mentioned in the three chapters above, the following step was to study the effects of diet on the microbiota. Currently, there is no consensus on how fast and reproducibly human gut microbiota can respond to short-term changes in the diet and there is scarce available information addressing this question. **Chapter 5** presented a screening study in which the effects of a high carbohydrate and a high protein diet on pH, SCFA and BCFA were characterized. This study aimed to provide insight about how fast changes in bacterial activity and composition can be induced in a 72 h fermentation when major perturbations were performed in the diet supplied to the microbiota.

With **chapter 5**, knowledge was gained about the impact of diet on the gut microbiota by observing a fast response (24h) from the microbiota to the different diets tested. The sensitivity of the TIM-2 as an *in vitro* system detecting such impact was also confirmed. Therefore, a comparison was performed between

fermentation by microbiota from lean and obese subjects. Hence, **chapters 6** and **7** monitored the fermentation of different prebiotic substrates (galacto-oligosaccharides, lactulose, apple fiber, sugar beet pectin (**chapter 6**), arabinogalactan and inulin (**chapter 7**) by the microbiota from lean or obese subjects. These studies helped to elucidate how different the contribution of energy by the microbiota to the host was during a fermentation process, in terms of metabolites produced. Contrary to expected, the extraction of energy from the obese microbiota differed per substrate and it was not higher in most of the cases when compared to the lean microbiota. Furthermore, the chapters also showed the specific modulation of the composition of the microbiota by these substrates.

Chapter 8 presents a study performed with the aim of: i) gaining insight about how the presence of mucin plays a role in the development of bacterial communities (*in vitro*), and ii) explore how representative a defined community harboring 14-members (comprising the 5 most dominant phyla in the healthy human gut) is in comparison to a complex community (derived either from lean or obese individuals). The majority of current *in vitro* models do not use the addition of mucin to the culturing media which results only in the simulation of luminal microbiota excluding microorganisms which profit from a mucosal environment to grow optimally. This lack of mucin makes it more challenging in achieving a representative simulation of the human gut compared to the *in vivo* situation. Although we found that more efforts are needed in achieving a better simulation of a complex microbiota by using a defined community, this chapter contributes with more insight about the growth of defined communities *in vitro* and evaluating their response to substrates derived from the host.

Samenvatting

Wereldwijd komt er een steeds hoger aantal obesitas-gevallen voor. Volgens schattingen van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) waren er in 2014 600 miljoen mensen obees. Bovendien breidt dit probleem zich ook uit naar kinderen: 42 miljoen kinderen onder de leeftijd van 5 jaar waren te zwaar of obees in 2013. Voor het eerst in de menselijke geschiedenis zijn er meer obese mensen dan mensen met ondergewicht op de wereld. Personen met obesitas zijn niet alleen gevoeliger voor ziektes, maar ervaren ook een lagere kwaliteit van leven en ze leiden vaak tot hogere kosten in de gezondheidszorg. Derhalve is de ontwikkeling van strategieën om deze situatie aan te pakken van levensbelang. De rol die het darmmicrobioom speelt bij obesitas is recentelijk aan het licht gekomen als veelbelovende geneeswijze. Daarom had dit werk als doelstelling: i) een bijdrage leveren aan de kennis over de impact van het darmmicrobioom op obesitas bij het fermenteren van onverteerbare bestanddelen van voedingsmiddelen, en ii) meer inzicht geven in de reactie van het microbioom op manipulatie en het potentieel het fenotype van een obese darm te modificeren. Bewijs uit de literatuur betreffende de rol van het microbioom bij obesitas wordt besproken in **hoofdstuk 1**.

Hoofdstuk 2 concentreert zich op de verschillen gerelateerd aan de samenstelling en activiteit van een individuele of een samengestelde bereiding van een menselijk fecaal inoculum gedurende een gestandaardiseerd fermentatie proces. Over het algemeen gebruiken veel *in vitro* studies een gestandaardiseerd inoculum dat voortkomt uit een groep interessante personen en dat ingevroren wordt bewaard. Het gebruik van een inoculum van een enkele donor of van een groep donoren blijft onder experts echter een bron van discussie. Het belangrijkste argument betreft de zorg over hoe representatief zo'n inoculum is vergeleken met het ecosysteem van de darm, rekening houdende met de veelheid en de variëteit van de soorten bacteriën. Dientengevolge kan het gebruik van een individueel of een gemengd inoculum leiden tot een mate van variatie in experimenten, zelfs wanneer een individueel inoculum herhaaldelijk wordt genomen van dezelfde persoon gedurende een bepaalde periode. Wat betreft het TIM-2 systeem werd er nog geen enkele studie uitgevoerd om zulke mogelijk variaties in kaart te brengen. Derhalve was het doel van dit onderzoek het vergelijken van beide bereidingswijzen voor een fecaal inoculum voor *in vitro* gebruik. De verkregen resultaten over de bruikbaarheid van de twee types van inoculum, lieten zien dat het microbioom dat werd bereid uit een groep van vrijwilligers niet resulteert in een afwijkende compositie of werking. Deze bevindingen zijn erg belangrijk voor de uitvoering van een evaluatie en verbetering van de gestandaardiseerde methoden voor de bereiding van het inoculum zelf.

In **hoofdstuk 3** is onderzoek gedaan naar een optimale conserveringsaanpak voor het bewaren van menselijke feces als inoculum voor *in vitro* fermentaties, als

alternatief voor het gebruik van verse feces. Het zou kunnen dat een vers verkregen fecaal monster niet altijd beschikbaar is. Onder bepaalde omstandigheden is het gebruik van een vers menselijk microbioom niet mogelijk, omdat donoren ver van het laboratorium vandaan wonen of omdat ze niet continu beschikbaar zijn om verschillende keren deel te nemen gedurende de studie. Om toch een constant inoculum te kunnen garanderen voor diverse onderzoeken gedurende een periode, gebruiken de meeste onderzoeken voorbereide en opgeslagen inocula. In deze gevallen voorziet het gebruik van ingevroren feces in meer flexibiliteit voor dit type van experimenten. Voorbereiding en opslag van fecale samples hebben echter een effect laten zien op de microbiële samenstelling, levensvatbaarheid en activiteit. Het is onbekend in hoeverre verschillende bereidings- en opslagmethoden het microbioom beïnvloeden en welke conserveringsmethode het beste is. Daarom werden de effecten van verschillende behandelingen, die worden aangewend om menselijke feces, gebruikt als inocula voor *in vitro* fermentatie, te bereiden, bestudeerd. Deze studie maakte het ons mogelijk een makkelijke en optimale bereiding op te stellen voor feces die gebruikt worden in *in vitro* fermentatie onderzoeken, welke in samenstelling en functionaliteit erg dicht bij de gouden standaard of referentie (verse feces) komen. Deze bevindingen dragen bij aan het vergroten van de reproduceerbaarheid van *in vitro* onderzoeken die kunnen worden uitgevoerd gedurende langere tijd met hetzelfde microbioom, hetgeen onmogelijk is met een enkel vers fecaal monster.

Hoofdstuk 2 en **3** zijn hoofdstukken in dit proefschrift die een gedeelte van het onderzoek naar de verschillende criteria beschrijven, waaraan voldaan moet worden door *in vitro* darmmodellen voordat zij worden beschouwd als representatief voor het monitoren van effecten van specifieke ingrepen aan en behandelingen van het microbioom. Het is echter even belangrijk om de robuustheid en de reproduceerbaarheid van het model zelf te waarborgen. In **hoofdstuk 4** is de samenstelling en de functionaliteit onderzocht van de microbiële populatie die zich ontwikkelde in TIM-2 gedurende een 72 uur durende fermentatie op een dieet dat ofwel veel koolhydraten ofwel veel eiwitten bevatte. Hierbij werd gebruik gemaakt van krachtige moleculaire technieken. Dit onderzoek werd uitgevoerd met het doel te testen of het netwerk dat dieet, microbioom en metaboliëtenproductie met elkaar verbindt, reproduceerbaar was in verschillende, op dezelfde manier opgezette, experimenten, waarbij TIM-2 werd gebruikt onder gelijkblijvende experimentele omstandigheden. Onze resultaten wijzen in de richting van een grote reproduceerbaarheid van de zich in TIM-2 ontwikkelende populaties, zowel op het vlak van samenstelling als op het vlak van functionaliteit. Na het evalueren van de methodologische overwegingen en uitdagingen genoemd in de drie voorgaande hoofdstukken, was de volgende stap het bestuderen van de

effecten van een dieet op het microbioom. Momenteel is er geen consensus over hoe snel en hoe reproduceerbaar het menselijke darm microbioom zich kan aanpassen aan korte termijn veranderingen in het dieet en er is maar weinig informatie te vinden met betrekking tot deze vraag. In **hoofdstuk 5** werd een screenings-onderzoek gedaan waarin de effecten werden gekarakteriseerd van een dieet met een hoog gehalte aan koolhydraten en een dieet met een hoog gehalte aan eiwitten op pH, korte-keten vetzuren en vertakte-keten vetzuren. Dit onderzoek had als doel inzicht te verschaffen in hoe snel veranderingen in bacteriële samenstelling en activiteit teweeg kunnen worden gebracht binnen een 72 uur durende fermentatie als er belangrijke veranderingen in het, aan het microbioom verstrekte, dieet worden aangebracht.

In **hoofdstuk 5** werd er kennis verzameld over de impact van het dieet op het darmmicrobiom door het waarnemen van een snelle respons van de microbiomen op de verschillende geteste diëten. De gevoeligheid van TIM-2 als *in vitro* waarnemingssysteem voor zo'n impact werd ook bevestigd. Derhalve werd er een vergelijking gedaan tussen fermentatie door het microbiom van dunne personen en van personen met overgewicht. Daarvoor werd in **hoofdstuk 6** en **7** de fermentatie gemonitord van verschillende prebiotische substraten (galactooligosacchariden, lactulose, appelvezel, suikerbietpectine (**hoofdstuk 6**) en arabinogalactaan en inuline (**hoofdstuk 7**) door het microbiom van ofwel dunne personen ofwel personen met overgewicht. Deze onderzoeken hielpen te verduidelijken hoe verschillend de bijdrage van energie door het microbiom aan de gastheer was gedurende het fermentatieproces, kijkend naar de geproduceerde metabolieten. In tegenstelling tot wat werd verwacht, was de extractie van energie door de obese microbiomen verschillend per substraat en niet verhoogd in de meeste gevallen, in vergelijking met het microbiom van dunne personen. Verder lieten de hoofdstukken ook de specifieke modulatie van de samenstelling van de microbiomen door deze substraten zien.

Hoofdstuk 8 presenteert een onderzoek uitgevoerd met als doel: i) inzicht verschaffen in de rol die de aanwezigheid van mucine speelt bij de ontwikkeling van bacteriële populaties (*in vitro*), en ii) onderzoeken hoe representatief een gedefinieerde populatie van 14-bacteriële species (die de 5 meest dominante species van een gezonde menselijke darm bevat) is in vergelijking met een complexe populatie (verkregen van ofwel dunne ofwel obese personen). Het grootste gedeelte van huidige *in vitro* modellen maken geen gebruik van de toevoeging van mucine aan de groeimedia. Dit heeft tot gevolg dat alleen luminale microbiomen gesimuleerd worden en de micro-organismen welke profiteren van een slijmerige omgeving om tot een optimale groei te komen, worden buitengesloten. Dit gebrek aan mucine maakt het moeilijker om tot een

representatieve simulatie van de menselijke darm te komen in vergelijking tot de *in vivo* situatie. Hoewel er, volgens onze bevindingen, meer inspanningen nodig zijn om een betere simulatie van een complex microbiom te bewerkstelligen door het gebruik van een gedefinieerde populatie, draagt dit hoofdstuk bij aan meer inzicht in de groei van gedefinieerde populaties *in vitro* en het evalueren van hun respons op substraten verkregen van de gastheer.

Samenvatting
